

Activité insecticide d'une souche marocaine de *Bacillus thuringiensis* sur la mouche méditerranéenne : *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera : Tephritidae)

Houda ABOUSSAID^{1,2}, Saïd EL MESSOUSSI² et Khalid OUFDOU^{1*}

¹*Equipe de Microbiologie et Toxicologie Environnementales, Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes*

²*Laboratoire de Modélisation moléculaire et Ecophysiologie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, BP 2390, Marrakech, 40000, Maroc.*

* Correspondance, courriel : oufdou@ucam.ac.ma

Résumé

Le présent travail consiste à étudier l'effet de deux types de toxines (δ -endotoxines et β -exotoxines) extraites à partir d'une souche de *Bacillus thuringiensis* (Bt A9) isolée d'un sol au Maroc sur la mouche *Ceratitis capitata* Wied (Diptera ; Tephritidae). Les endotoxines de Bt A9 agissent sur la mortalité des larves et la longévité des adultes. Par contre, les exotoxines présentent un effet notamment sur l'émergence des adultes. Les résultats de cette étude montrent que la souche Bt A9 présente une activité insecticide importante sur *C. capitata*. Les toxines de cette souche pourraient être utilisées dans la lutte biologique de cet insecte ravageur de plusieurs cultures fruitières au Maroc.

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis*, activité insecticide, *ceratitis capitata*, endotoxines, exotoxines.

Abstract

Insecticidal activity of Moroccan strain of *Bacillus thuringiensis* against Mediterranean fruit fly: *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera : Tephritidae).

The current study describes the effects of toxins (δ -endotoxins and β -exotoxins) of *Bacillus thuringiensis* Moroccan strain (Bt A9) against mediterranean fly *Ceratitis capitata* Wied (Diptera; Tephritidae). We found that Bt A9 strain present an important insecticidal activity against *C. capitata*. The δ -endotoxins showed insecticidal

activity on larvae of *C. capitata* and on the longevity of adults. As for the β - exotoxins, they are toxic on the emergence of adults. The toxins produced by the studied Moroccan telluric strain of *B. thuringiensis* may have potential biotechnological value as a biological control against *C. capitata*.

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, insecticidal activity, *Ceratitis capitata*, endotoxins, exotoxins.

1. Introduction

Les dommages résultant des pullulations d'insectes sont importants et variés. En effet, les insectes causent l'affaiblissement ou la mort des cultures, des pertes de production et la dépréciation de la valeur marchande des produits agricoles. D'où la nécessité de parvenir à une protection à la fois efficace, d'un coût raisonnable, respectueuse de l'environnement et réalisable d'un point de vue socio-économique.

La mouche méditerranéenne *Ceratitis capitata* Wied. (*Diptera*; *Tephritidae*) compte parmi les ravageurs de fruits les plus nuisibles au monde, de part sa capacité à tolérer les climats tropicaux mieux que la plupart des mouches de fruits et son caractère polyphagique puisqu'elle attaque une large gamme d'espèce hôtes (250 espèces végétales) dont la majorité est représentée par les arbres fruitiers [1].

Au Maroc, une enquête a été menée afin d'évaluer les pertes causées par la cératite sur les principaux arbres fruitiers [2]. Elle a estimé les pertes annuelles sur les agrumes et les autres vergers (pommes, abricots, pêches, prunes...) à 53 422 200 DH. Plus de 90% de cette somme est utilisée pour l'achat des pesticides chimiques et dont la grande partie est payée en devise pour l'importation des insecticides et du matériel de traitement. D'autre part, l'évolution que connaît l'Europe (premier importateur de produits agricoles marocains) dans le cadre de la lutte biologique contre les entomophages nuisibles, nous incite à la recherche d'une méthode de lutte spécifique pour l'établissement de zones exemptes de la mouche méditerranéenne de fruits. La lutte microbiologique de la cératite par les toxines produites par *Bacillus thuringiensis* (Bt) constituerait une méthode de lutte biologique alternative qui respecte l'environnement.

Bt est une bactérie aérobie à Gram positif, capable de produire pendant la phase de sporulation une gamme de toxines insecticides vis-à-vis de plusieurs insectes [3]. Ce complexe de toxines contient souvent plusieurs types de δ -endotoxines ou "cry" de nature protéique et qui interagissent avec des récepteurs spécifiques sur les cellules épithéliales du système digestif de l'insecte, causant la disruption de la régulation osmotique de la cellule épithéliale et la mort éventuelle des cellules. Ces changements

résultent en la paralysie de ce système digestif, la perte des fonctions de digestion et enfin la mort de l'insecte suite de la cessation de l'alimentation [4].

Bt peut également synthétiser d'autres toxines, dont la β -exotoxine. Cette dernière diffère grandement de la δ -endotoxine. La β -exotoxine est de nature nucléotidique, extracellulaire, thermostable et soluble dans l'eau [5]. Les exotoxines sont connues pour être particulièrement toxiques contre les espèces Diptères [6]. Bt est une bactérie abondante dans la nature, biodégradable, et présente une action létale rapide sur les ravageurs ciblés [7]. D'ailleurs, il a été démontré que les formulations de Bt sont sans danger pour l'environnement ainsi que pour l'Homme. En outre, le coût de développement de ces formulations de Bt est largement inférieur à celui des pesticides chimiques conventionnels [8]. A elle seule, Bt accapare aujourd'hui plus de 80 % du marché mondial des agents microbiens de lutte contre les ravageurs de l'agriculture [9]. Au Maroc, peu de travaux se sont intéressés à la lutte biologique de *C. capitata* et notamment par des microorganismes dont la bactérie Bt.

Le présent travail a pour objectif d'isoler une souche de Bt à partir de différents sites géographiques au Maroc et d'évaluer par la suite son potentiel insecticide sur *C. capitata*.

2. Matériel et méthodes

2-1. Isolement et croissance de la souche Bt A9

L'échantillon de sol a été collecté au sud du Maroc à une profondeur de 10 à 15 cm au dessous de la surface du sol, puis conservé au froid.

L'isolement de Bt a été effectué selon la méthode décrite par Ohba et Aizawa [10]:

◆ Phase d'isolement :

Un gramme de l'échantillon de sol a été mis en suspension dans 10 mL d'eau distillée stérile et a été chauffé à 70°C pendant 30 minutes. Ce traitement devrait exclure la plupart des cellules végétatives non sporulées de bactéries.

0.1 mL des suspensions de sol ou de leurs dilutions, a été étalé sur la gélose nutritive (Difco) (pH 6.8). Après incubation à 30°C pendant 3 jours, les colonies bactériennes ont été isolées puis purifiées après plusieurs repiquages sur la gélose nutritive.

◆ Phase d'enrichissement sélectif :

Les colonies bactériennes isolées ont été mises dans le bouillon nutritif contenant de l'acétate de sodium à 0.25 M et agitées pendant 4 h à 200 t/min à une température de 30°C. La solution a été chauffée à 80°C pendant 3 minutes et puis étalée par

striation sur la gélose nutritive. L'incubation des colonies a été effectuée durant une nuit à 30°C pour vérifier la présence de l'inclusion en cristal.

◆ **Phase d'identification :**

Les colonies bactériennes ont été incubées à la température ambiante pendant 2 à 3 jours. Le frottis bactérien a été préparé avec de l'eau distillée stérile puis laissé sécher à l'air et fixé légèrement sur une lame à la chaleur, puis coloré à la fuschine. On l'examine sous microscope au G x 1500 pour vérifier la présence de spores libres et de cristaux. Les cristaux sont généralement plus petits que les spores [11].

◆ **Phase de sporulation :**

Après identification par coloration spécifique du corps parasporal, les colonies de Bt ont été transférées dans 1 mL d'eau distillée stérile puis pasteurisées à 70°C pendant 30min.

Les suspensions ont été transférées dans 250 mL du milieu PWYE (peptone 5%, extrait de levure 0.1%, NaCl 0.5%, pH 7.5) et ont été incubées à 30°C pendant 8 à 15 h sous une agitation de 180 t/min.

Deux millilitres de la culture de PWYE ont été utilisés pour inoculer un litre du milieu minimal de sporulation B₄ [12] et ont été incubés à 30°C pendant 3 à 4 jours sous une agitation de 180 t/min. Au moins 90% des cellules bactériennes ont été lysées libérant ainsi les spores et les cristaux.

◆ **Phase de purification des cristaux et des spores :**

Les spores et les cristaux (δ -endotoxines) ont été rassemblés dans le culot après centrifugation à 10.000g pendant 10 min. Ces granules ont été lavées trois fois avec de l'eau distillée froide (4°C), puis rassemblés dans le culot et ont été suspendues dans 20 ml d'eau distillée. tandis que les surnageants des échantillons autoclavés à 121°C pendant 10 min, ont été employés pour déterminer la présence de β -exotoxines [13].

Le mélange de spores-cristaux ainsi que celui des exotoxines ont été stockées à -20°C pour tester leur activité insecticide.

Le volume de chacune des suspensions a été ajusté avec de l'eau distillée pour le calcul de l'absorbance à 600 nm pour une dilution au 1/100 [14]. Par la suite, ces volumes ont été lyophilisés afin d'être utilisés dans les biotests de toxicité sur *C. capitata*.

2-2. activité insecticide de Bt A9

2-2-1. Traitement des larves par les toxines

Les larves de la cératite ont été récupérées à partir de fruits infestés. Trente larves de 3^{ème} stade ont été placées dans des boîtes de Petri en verre (9cm de diamètre), contenant du papier filtre Whatman, imprégné avec la solution de toxines ou avec de l'eau distillée pour le témoin. Chaque boîte de Petri contient une concentration différente des endotoxines ou des exotoxines (0.15mg/mL, 0.25mg/mL, 0.30mg/mL et 0.50mg/mL). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque type de toxine ainsi que pour le témoin.

Après 24 heures d'exposition aux toxines de Bt, les larves mortes sont comptées (taux de mortalité larvaire), tandis que les larves survivantes aux toxines ont été transférées dans des tubes après leur pupaison pour un contrôle journalier afin de déterminer le nombre d'adultes émergés (pourcentage d'émergence des adultes).

2-2-2. Traitement des adultes par les toxines

30 individus adultes de la cératite ont été placés dans des cages (20 x 25 cm), contenant une solution nutritive à base de saccharose et d'hydrolysate de protéine (3:1) et un volume de 1mL des 4 concentrations de Bt A9 contenant les toxines (les endotoxines ou les exotoxines) ou de l'eau distillée pour le témoin. Un contrôle journalier a été réalisé pour déterminer le nombre des adultes morts.

Tous les biotests ont été menés dans une salle climatisée à 25°C avec une humidité relative (HR) de 60% et une photopériode de 12h/12h (lumière/obscurité).

2-3. Analyses statistiques

La concentration létale 50 (CL₅₀) des toxines de Bt A9 sur les larves de *C. capitata* a été déterminée par projection sur logiciel Probit analysis version 1.5. L'analyse des effets des endotoxines et des exotoxines sur la mortalité des larves et sur l'émergence des adultes a été réalisée par comparaison des moyennes obtenues sur 3 répétitions (comparaison des intervalles de confiance).

En ce qui concerne l'effet des endotoxines et des exotoxines sur les adultes, la comparaison entre les pourcentages de mortalité des adultes de *C. capitata* a été effectuée en utilisant le test des deux proportions ou fréquences décrit par Schwartz [15]. Ce test montre si il existe une différence significative entre deux

fréquences : f_1 observé sur l'échantillon n_1 et f_2 observé sur l'échantillon n_2 . Ce test est déterminé par l'équation suivante :

$$t = \frac{f_1 - f_2}{\sqrt{f(1-f)(1/n_1 + 1/n_2)}} \quad \text{avec } f = \frac{n_1 f_1 + n_2 f_2}{n_1 + n_2}$$

Si $|t| < 1.96$: la différence entre f_1 et f_2 est non significative ($p > 0.05$).

Si $|t| \geq 1.96$: la différence entre f_1 et f_2 est significative ($p \leq 0.05$).

3. Résultats et discussion

3-1. Isolement de la souche Bt A9

L'utilisation de l'aspect macroscopique des colonies comme critère de reconnaissance et d'isolement de Bt, nous oriente vers les bactéries du groupe *Cereus* comportant Bt. Toutefois, les bactéries du groupe *Cereus* présentent un aspect macroscopique similaire.

L'analyse des souches du groupe *Cereus* par microscope optique après coloration, permet de mettre en évidence la présence du corps d'inclusion parasporal qui n'est présent que chez Bt (**Figure 1**), tandis que pour les autres bactéries du groupe *Cereus*; ce corps parasporal est absent [16].

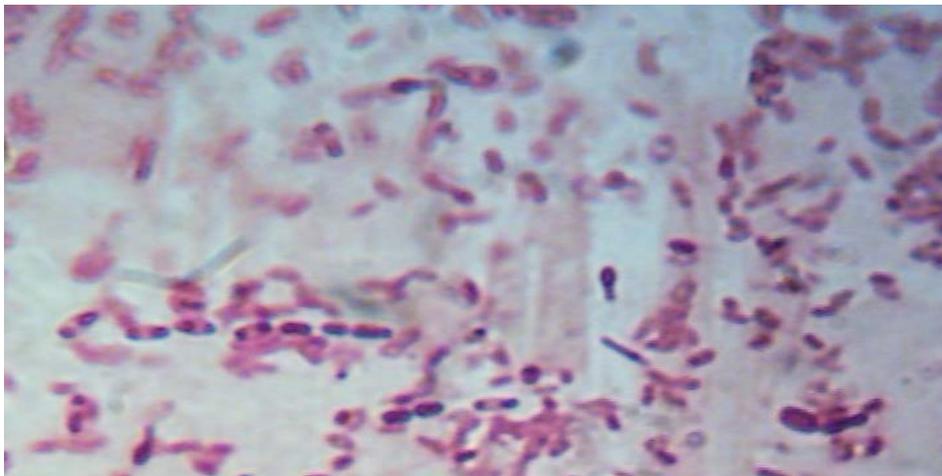


Figure 1 : Photo de la culture sporulée de la souche de *Bacillus thuringiensis* (Bt A9) avec le corps d'inclusion parasporal (P) (G x 1500)

Les colonies de Bt A9 présentent une forme arrondie de consistance crémeuse et dont le diamètre est de 4,5 mm.

Les cristaux sont généralement plus petits que les spores et qui apparaissent après coloration en corps plus foncé attachés avec les spores sous forme d'un "cap" chez les jeunes cultures. Pour les vieilles cultures, les spores sont toujours libres après la lyse du sporange (*Figure 1*).

La détection des cristaux par la technique de coloration dans les cultures jeunes, reste difficile à cause de leur petite taille. Pour ce motif, les cultures devraient être maintenues à la température ambiante encore quelques jours (3 à 4 jours) supplémentaires, puis réexaminées pour la présence du cristal. Le Bt produit généralement des cristaux protéiniques soit sous forme de cristaux libres, soit sous forme de corps d'inclusion parasporal dans l'exosporium [11].

L'utilisation de l'acétate de sodium comme facteur sélectif d'isolement de Bt a permis l'élimination de la plupart des autres bactéries génératrices de spores et tous les organismes non générateurs de spores dans l'échantillon du sol. Cette méthode bloque la germination de spores des bactéries non désirées non éliminées par le traitement thermique. L'utilisation de l'acétate de sodium présente un effet similaire que celui des antibiotiques (ampicilline-polymixine B) [17].

3-2. Test de toxicité sur *C. capitata*

La toxicité de la souche tellurique de Bt A9 vis-à-vis de *C. capitata* (adultes et larves) a été étudiée. Le mélange cristal-spore de Bt a été inclus dans ce test, car il présente un effet synergique et provoque une mortalité élevée en comparaison au cristal ou spore seul [10-18].

afin d'étudier l'effet des toxines (endotoxines et exotoxines) extraites de Bt A9 sur *C. capitata*, nous avons déterminé la concentration létale 50 (CL₅₀) des larves, le pourcentage d'émergence des adultes et le taux de mortalité des adultes.

3-2-1. Effet des toxines sur les larves de *C. capitata* :

Les résultats des effets des toxines isolées de la souche de Bt A9 vis-à-vis des larves de la cératite sont présentés dans la *Figure 2*. après 24 heures d'application des endotoxines, certaines larves ont été retrouvées mortes, les autres se sont transformées en pupes.

Les larves de la cératite ont été hautement sensibles aux endotoxines produites par Bt A9, avec une CL₅₀ de 0,185 qui correspond à 65% de mortalité, en comparaison au

témoin dont le taux de mortalité est seulement de l'ordre de 26%. Cette différence est significative au seuil de 95% (**Figure 2**).

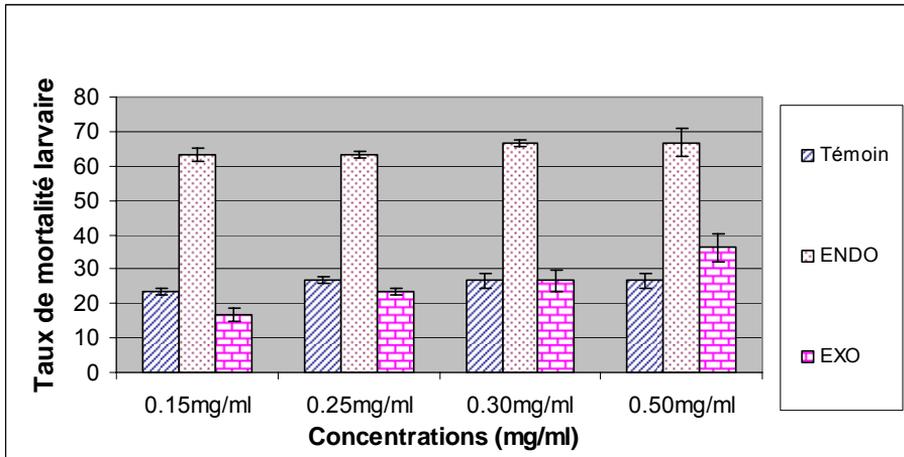


Figure 2 : Effet des toxines de la souche de Bt A9 sur le taux de mortalité larvaire de *C. capitata* (ENDO : endotoxines ; EXO : exotoxines)

En ce qui concerne l'effet des exotoxines, elles n'ont pas présenté une activité insecticide vis-à-vis des larves de *C. capitata*. Le taux de mortalité enregistré pour les exotoxines n'est pas significativement différent de celui noté pour le témoin pour les concentrations de 0.15, 0.25 et 0.30 mg/mL. Néanmoins, nous avons noté qu'à la concentration de 0.50mg/mL, les exotoxines augmentent le taux de mortalité des larves de la cératite en comparaison aux autres concentrations testées.

La durée d'action rapide des endotoxines sur les larves est l'une des caractéristiques des endotoxines puisque les symptômes provoqués par l'ingestion de ces toxines se développent pendant 24 à 96 heures [18].

Les travaux menés par Elzbieta *et al.* [19] ont démontré que les endotoxines présentent un effet larvicide important qui varie de 41 à 81% de mortalité selon la souche de Bt utilisée. La toxicité des endotoxines notée chez la souche Bt A9 pourrait être due à l'expression des gènes (Cry). Ces gènes sont responsables de la synthèse de ce type de toxines au moment de la sporulation et influencent l'activité de Bt vis-à-vis des insectes [3].

3-2-2. Effet des toxines sur l'émergence des adultes de *C. capitata*

Le pourcentage d'émergence des adultes à partir des pupes diffère selon la concentration utilisée d'une part et le type de toxine d'autre part (**Figure 3**). Les endotoxines de Bt A9 entraînent une diminution significative du pourcentage

d'émergence des adultes enregistré avec la concentration de 0.15mg/mL (20%) en comparaison avec le témoin dont le pourcentage d'émergence des adultes est de 36%. A la même concentration, ce pourcentage est significativement plus faible en présence des exotoxines (15%).

Dans tous les cas, les concentrations utilisées des endotoxines et des exotoxines de Bt A9 entraînent une diminution significative de l'émergence des adultes de *C. capitata* (**Figure 3**).

Oliveira *et al.* [20] ont démontré que l'effet des endotoxines sur l'émergence des adultes reste significativement élevé (de 26% à 76.7%) et variable d'une souche à l'autre.

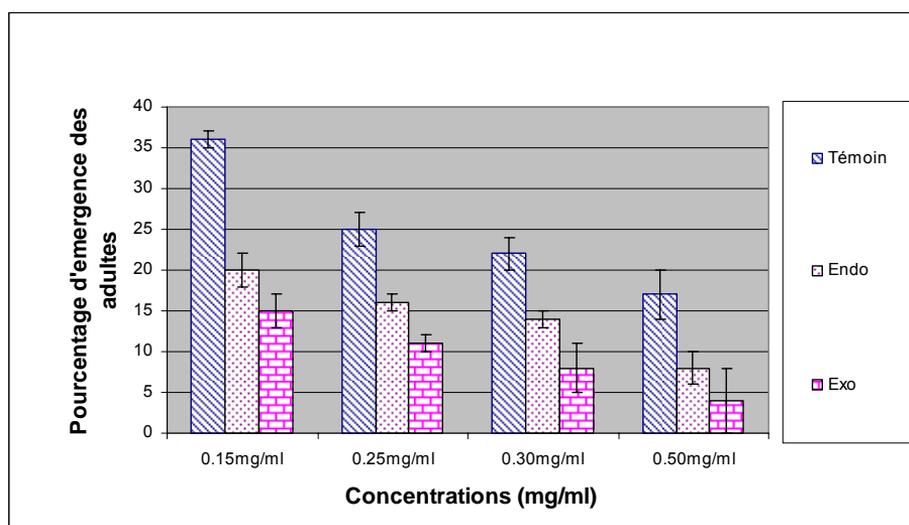


Figure 3: Effet des toxines de la souche de Bt A9 sur l'émergence des adultes de *C. capitata* (ENDO : endotoxines ; EXO : exotoxines)

La diminution du pourcentage d'émergence des adultes observée en présence des endotoxines pourrait être due à la réaction des larves aux endotoxines avant l'entrée en pupaison. En effet, la mortalité des larves traitées par les endotoxines de Bt s'explique par l'efficacité du processus de conversion (la protéolyse) des protoxines en fractions toxiques. Ces toxines ingérées par l'insecte provoquent la paralysie du système digestif qui cause sa mort suite à l'impossibilité de s'alimenter [21].

Pour ce qui est de l'effet des exotoxines, elles présentent un effet important sur l'émergence des adultes (**Figure 3**) en comparaison avec leur effet sur les larves (**Figure 2**). Ces résultats sont comparables à ceux de Toledo *et al.* [22]. Ces auteurs

ont rapporté que les exotoxines interfèrent surtout avec l'émergence des adultes plutôt que sur la mortalité des larves.

3-2-3. Effet des toxines sur les adultes de *C. capitata*

Les endotoxines de la souche de Bt A9 ont entraîné une augmentation significative de la mortalité des adultes de la cératite (**Tableau 1**). Le taux de mortalité enregistré atteint 100% après 3 jours d'application des endotoxines. Tandis que pour le témoin, le taux de mortalité demeure significativement faible (test de Schwartz, $p < 0.05$) avec un taux de mortalité de seulement 20%.

Tableau 1 : Effet des toxines de la souche de Bt A9 sur le taux de mortalité des adultes de *C. capitata*.

Concentrations	0.15mg/mL	0.25mg/mL	0.30mg/mL	0.50mg/mL
Témoin	20%	20%	14%	17%
Endotoxines	100%	100%	100%	100%
Exotoxines	44%	50%	47%	47%

En ce qui concerne les exotoxines, elles ont entraîné un taux de mortalité significativement plus élevé (de 44 à 50%) par rapport au témoin (test de Schwartz, $p < 0.05$). L'effet des exotoxines est moins important que celui enregistré en présence des endotoxines (**Tableau 1**).

Ces résultats restent comparables à ceux trouvés par Alberola *et al.* [13]. Ces auteurs ont démontré que la mortalité des adultes engendrée par les endotoxines est hautement différente de celle engendrée par les exotoxines. La mortalité des adultes est de 15% à 89.2% en présence des endotoxines tandis qu'elle n'est que de 2.7% à 25% en présence des exotoxines [13]. Cette différence observée entre les endotoxines et les exotoxines est due à plusieurs facteurs notamment au type de la souche utilisée de Bt, à l'origine des toxines, leur mode et durée d'action [13].

La mortalité des adultes provoquée par les exotoxines pourrait être due à la présence dans le surnageant de la culture de Bt, du thuringiensin (β -exotoxine) qui présente un effet insecticide important [23].

4. Conclusion

Dans la région méditerranéenne, *C. capitata* est le ravageur le plus redoutable, puisqu'il attaque un grand nombre d'espèces fruitières (agrumes, figuier, arganier...) dont la production s'étale sur toute l'année [24]. La viabilité des agents de contrôle biologique contre cette mouche devrait diminuer la plupart des problèmes environnementaux liés à l'utilisation des insecticides chimiques.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail montre que les deux types de toxines appliquées (endotoxines et exotoxines) de la souche marocaine Bt A9 ont présenté une activité insecticide sur les deux stades larvaire et adulte de *C. capitata*. L'utilisation des toxines à partir de la souche Bt A9 a permis de réduire les populations de la cératite. Les endotoxines agissent principalement sur la mortalité des larves et des adultes. Cette réduction a atteint 65% pour les larves et 100% pour les adultes de *C. capitata*. En ce qui concerne les exotoxines, leur effet s'observe clairement au moment de l'émergence des adultes.

Cette étude a confirmé la possibilité de trouver des bioinsecticides naturels à base de Bt qui peuvent être toxiques contre les deux stades nuisibles de la cératite (larve et adulte) grâce aux deux types de toxines synthétisées par cette bactérie.

Les biopesticides de la souche Bt A9 présenteraient un intérêt biotechnologique important dans la lutte biologique de cet insecte ravageur de plusieurs plantes au Maroc.

Références

- [1] - S. Quilici, "La mouche méditerranéenne des fruits ou cératite (*Ceratitis capitata*) (Wied) (Diptera : Tephritidae)", CIRAD (1999) 44-64
- [2] - A. Driouchi et E. J. Buycks, "Rapport d'une réunion des agro-économistes nationaux sur l'évolution des pertes économiques causées par la cératite", RAF/5/013- enquête sur l'étendue de l'infestation par la cératite en Afrique du nord. Meknès (Maroc), (1990)
- [3] - C. Martinez and P. Caballero, "Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats", *J. Appl. Microbiol.*, 92 (2002) 745-752
- [4] - J. O. Lacousière et J. Boisvert, "Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec", Ministère de l'Environnement, Envirodoq no ENV/2004/0278, (2004) 101 p

- [5] - P. Faust and L. Bulla, "Bacteria and their toxins as insecticides", In E. Kurstak [ed.], Microbial and viral pesticides. Mercel Dekker, New York (1982) 75–208
- [6] - K. Sebesta., J. Farkas., K.V. Horska, "Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*", In H. D. Burges [ed.], Microbial control of pests and plant diseases, 1970–1980. Academic, New York (1981) 249–281
- [7] - F. MOSCARDI, "Assesment of the application of baculovirus for control of Lepidopteres", Annu. Rev. Entomol., 44 (1999) 257-289
- [8] - B. Lambert and M. Peferoen, "Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*", *Bioscience*, 42 (1992) 112-122
- [9] - T. R. Glare and M. O'Callaghan, "*Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety", John Wiley & Sons, Ltd (2000) 350 p
- [10] - M. Ohba and K. Aizawa, "Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan", *J. Inverteb. Pathol.*, 47 (1986) 12-20
- [11] - D. Douey et I. Iugovaz, "Isolement et numération de *Bacillus cereus* dans les aliments. Direction Générale des produits de santé et des aliments», Ottawa, MFLP (2003) 13 p
- [12] - H. T. Dulmage et K. aizawa, "Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control", In H. D. Burges (ed.), Microbial control of pest and plant diseases 1970- 1980. Academic Press, London (1981) 193-222
- [13] - T. M. Alberola, S. Aptosoglou, M. Arsenakis, Y. Bel, G. Delrio, D. J. Ellar, J. Ferré, F. Granero, D. M. Guttman, S. Koliais, M. J. Martínez-Sebastián, R. Prota, S. Rubino, A. Satta, G. S. Sivropoulou and A. E. Vasara, "Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adult of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae)", *J. Invertebr. Pathol.*, 74 (1999) 127-136
- [14] - J. M. Gough, H. D. Kemp, R. J. Akhurst, R. D. Pearson and K. Kongsuwan, "Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucia cuprina*", *J. Invertebr. Pathol.*, 90 (2005) 39-46
- [15] - D. SCHWARTZ, " Méthodes statistiques à l'usage des Médecins et des Biologistes",. 3^{ème} édition. Paris., Flammarion Médecine-Sciences. (1963). ISBN 2-257-10326-2
- [16] - H. Höfte and H. R. Whiteley, "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*", *J. Microbiol. Rev.*, 53 (1989) 242-255
- [17] - R. S. Travers, P. A. W. Martin and C. F. Reichelderfer, "Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.", *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 6 (1987) 1263-1266
- [18] - G. Karamanlidou, A. F. Lambropoulos, S. I. Koliais, T. Manousis, D. Ellar and C. Kastritsis, "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*)", *J. Applied Environ. Microbiol.*, 57 (1991) 2277– 2282

- [19] - L. Elzbieta, D. Wlodzimierz, M. J. Klowden, K. Rydzanicz and A. Galgan, "Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against Dipteran larvae", *J. Vect. Ecol.*, (2001) 15-20
- [20] - M. S. OLIVEIRA, M. A. NASCIMENTO, C. F. G. CAVADOS, J. Q. CHAVES, L. RABINOVITCH, M. M. LIMA and M. M. C. QUIEIROZ. "Biological activity of *Bacillus thuringiensis* strains against larvae of the Blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)", *Neotropical Entomology*, 35 (2006) 849–852
- [21] - T. L. Hopkins and K. J. Kramer, "Insect cuticle sclerotization", *Annu. Rev. Entomol.*, 37 (1992) 273–302.
- [22] - J. Toledo, P. Liedo, L. T. Williams and J. Ibarra, "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae)", *J. Econ. Entomol.*, 92(5) (1999) 1052–1056
- [23] - C. M. Ignoffo and B. Gregory, "Effects of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera", *J. Environ. Entomol.*, 1 (1972) 269–272
- [24] - A. Mazih, "Recherche sur l'écologie de la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata* Wiedman (Diptera: Tephritidae), dans la plaine de Souss (Maroc) ", Thèse d'Etat. Institut Agronomique et Vétérinaire (IAV) Hassan II, Agadir (Maroc) (1992) 159p.